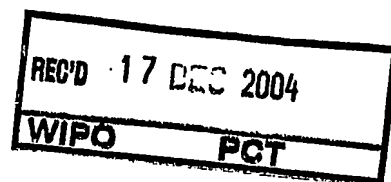




PCT/IB 04 / 04 125

(17. 12. 04)

**SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
CONFÉDÉRATION SUISSE
CONFEDERAZIONE SVIZZERA**



Bescheinigung

Die beiliegenden Akten stimmen mit den ursprünglichen technischen Unterlagen des auf der nächsten Seite bezeichneten Patentgesuches für die Schweiz und Liechtenstein überein. Die Schweiz und das Fürstentum Liechtenstein bilden ein einheitliches Schutzgebiet. Der Schutz kann deshalb nur für beide Länder gemeinsam beantragt werden.

Attestation

Les documents ci-joints sont conformes aux pièces techniques originales de la demande de brevet pour la Suisse et le Liechtenstein spécifiée à la page suivante. La Suisse et la Principauté de Liechtenstein constituent un territoire unitaire de protection. La protection ne peut donc être revendiquée que pour l'ensemble des deux Etats.

Attestazione

I documenti allegati sono conformi agli atti tecnici originali della domanda di brevetto per la Svizzera e il Liechtenstein specificata nella pagina seguente. La Svizzera e il Principato di Liechtenstein formano un unico territorio di protezione. La protezione può dunque essere rivendicata solamente per l'insieme dei due Stati.

Bern, 14. DEZ. 2004

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Eidgenössisches Institut für Geistiges Eigentum
Institut Fédéral de la Propriété Intellectuelle
Istituto Federale della Proprietà Intellettuale

Patentverfahren
Administration des brevets
Amministrazione dei brevetti

H. Jenni
Heinz Jenni

BEST AVAILABLE COPY

Hinterlegungsbescheinigung zum Patentgesuch Nr. 02135/03 (Art. 46 Abs. 5 PatV)

Das Eidgenössische Institut für Geistiges Eigentum bescheinigt den Eingang des unten näher bezeichneten schweizerischen Patentgesuches.

Titel:

Verfahren zur Konzentration und Aufreinigung von biologischen Substanzen.

Patentbewerber:

René Pellaux
Sihlfeldstrasse 150
8004 Zürich

Anmeldedatum: 15.12.2003

Voraussichtliche Klassen: B01D, B01J, C12N

Uebertragen an:

preen Tec AG
Esc. du Court-Chemin 19
1704 Fribourg
(Inhaber/in)

reg: 02.06.2004

Technisches Gebiet

5

Die Erfindung betrifft Materialien und Verfahren zur Konzentration, Entsalzung, Aufreinigung oder Stabilisierung von biologischen Substanzen, insbesondere biologischen Makromolekülen, mittels Superabsorbenten oder superabsorptiven Kompositmaterialien.

10

Stand der Technik

Superabsorbenten sind seit vielen Jahren in technischer Literatur und Patentschriften beschrieben und werden heute im grosstechnischen Massstab hergestellt. Kommerziell erhältliche Superabsorbenten bestehen meist aus Derivaten der Acrylsäure; oft handelt es sich um Copolymere der Acrylsäure und des Acrylamides. Die Herstellung und Eigenschaften solcher Polymere sind vielfach beschrieben worden (Bucholz 1998). In der technischen Literatur ist zudem die Verwendung von Superabsorbenten für Konzentration und Entsalzung von Proteinen beschrieben worden (Chacon 2000, Iritani 1993, 2001, 2003, Prazeres 1995).

Sorptive Kompositmaterialien sind in der Patentschrift PCT/EP02/12050 beschrieben worden. Diese Materialien sind Composite aus acrylischen Polymeren und Sorbenten und eignen sich dazu, Sorbate aus komplexen Mischungen zu sorbieren. In der Patentschrift PCT/EP02/12050 ist auch beschrieben, dass eine solche Sorption neben der Selektivität des Sorbenten auch durch die Grössenselektion des acrylischen Polymers beeinflusst wird.

30

Darstellung der Erfindung

Im Sinne der Erfindung werden Superabsorbenten und superabsorptive Kompositmaterialien für die Konzentration, Entsalzung, Aufreinigung oder

Stabilisierung von Proben verwendet. Die Superabsorbenten und die superabsorptive Komponente der superabsorptiven Kompositmaterialien im Sinne der Erfindung zeichnen sich insbesondere durch eine, mehrere oder alle der folgenden Eigenschaften aus:

- 5 - Sie sind hydrophile Polymere.
- Sie sind natürliche, semisynthetische oder synthetische Polymere.
- Sie sind vernetzte Polymere, bevorzugterweise mit einem Vernetzungsgrad von 0.0001 – 10 %, weiter bevorzugt mit einem Vernetzungsgrad von 0.01 % - 1 %.
- 10 - Sie sind aus Derivaten der Acrylsäure oder der Methacrylsäure aufgebaut, bevorzugterweise aus Amiden, Estern der Acrylsäure oder der Methacrylsäure.
- Sie enthalten ionisierte oder ionisierbare Derivate der Acrylsäure, wobei die ionisierten oder ionisierbaren Monomere bevorzugterweise
- 15 in einer Konzentration von 0.1 – 100 % der totalen Monomerkonzentration enthalten sind.
- Sie liegen in Form von Pulver, globulären Partikeln oder als Beschichtungen einer Oberfläche vor. Bevorzugterweise liegen sie in Form kugelförmiger Partikel vor, weiter bevorzugt als Kugeln mit
- 20 einem Durchmesser von 0.001 bis 10 mm, insbesondere als Kugeln mit einem Durchmesser von 0.01 – 0.5 mm.
- Sie absorbieren grosse Mengen hydrophiler Lösungsmittel, insbesondere Wasser, und schwellen dabei auf ein mehrfaches ihres ursprünglichen Volumens an.

25

Die superabsorptiven Kompositmaterialien zeichnen sich dadurch aus, dass sie neben dieser superabsorptiven Komponente, weitere Komponenten enthalten. Bevorzugterweise handelt es sich bei diesen weiteren Komponenten um Sorbenten. Ein Sorbent im Sinne der Erfindung ist ein Material, welches ein Sorbat zu sorbieren

30 vermag.

Bevorzugte Sorbenten sind anorganische Feststoffe wie elementare Metalle, Nichtmetalle und deren Verbindungen. Bevorzugte Verbindungen sind Oxide, Hydroxide, Carbonate, Silicate, Phosphate, Sulfate und Halogenide. Bevorzugte Oxide sind die Oxide des Aluminiums, Magnesiums, Siliciums, Titaniums und

Zirkoniums. Weiter bevorzugt sind poröse Aluminiumoxide und Silicagele wie sie beispielsweise für chromatographische Anwendungen und Festphasenextraktion kommerziell erhältlich sind. Beispiele schliessen ein: octadecyl-, octyl-, cyclohexyl-, phenyl-, ethyl-, cyanopropyl-, aminopropyl und propandiol-funktionalisierte poröse Silicagele. Weitere bevorzugte Silikate sind Celite®, Talk, Magnesiumsilicate wie Florisil®, Zeolite wie Molekularsiebe, Tonerden wie Kaoline, Montmorillonite, organisch modifizierte Montmorillonite, Bentonite, und Fullers Erden. Weiter bevorzugte anorganische Feststoffe sind Hydroxyapatite, Graphite und Aktivkohlen.

Weitere bevorzugte Sorbenten schliessen organische Feststoffe ein, beispielsweise natürliche oder chemisch synthetisierte Polymere. Bevorzugte natürliche Polymere sind Poly(hydroxyalkanoate), Polylactate, Polybutyrate and Polysaccharide. Weiter bevorzugte Polysaccharide sind Cellulose und Cellulosederivate sowie Agarose und Agarosederivate. Bevorzugte chemisch synthetisierte Polymere sind vernetzte Polystyrolverbindungen sowie chemisch funktionalisierte vernetzte Polystyrolerivate, wie sie beispielsweise als schwache oder starke Anionen- oder Kationenaustauscher kommerziell erhältlich sind. Weitere bevorzugte chemisch synthetisierte Polymere sind chelatbildende Absorbenten, Affinitätsabsorbenten und molekular imprintete Polymere.

Proben im Sinne der Erfindung sind alle flüssigen oder verflüssigten Gemische bestehend aus einer Zielstruktur und einer Flüssigkeit, wobei die Zielstruktur in dem Gemisch gelöst oder suspendiert ist. Bevorzugterweise handelt es sich bei der Flüssigkeit um ein hydrophiles Lösungsmittel, weiter bevorzugt ist Wasser. Die Probe kann neben der Zielstruktur und der Flüssigkeit noch weitere Stoffe enthalten, beispielsweise Salze oder Verunreinigungen. Wird die Probe mit einem Superabsorbenten oder einem superabsorptiven Kompositmaterial in Kontakt gebracht, werden eine, mehrere oder alle Komponenten der Probe durch den Superabsorbenten oder das superabsorptive Kompositmaterial absorbiert. Wird durch den Kontakt anteilmässig mehr Lösungsmittels absorbiert als Zielstruktur, so wird der in Lösung befindliche Teil der Zielstruktur konzentriert. Wird durch den Kontakt anteilmässig mehr Lösungsmittel und darin gelöste Salze absorbiert als Zielstruktur, so wird der in Lösung befindliche Anteil der Zielstruktur entsalzt. Wird durch den Kontakt anteilmässig mehr Lösungsmittel und darin enthaltene Verunreinigungen absorbiert als Zielstruktur, so wird der in Lösung befindliche Teil der Zielstruktur

aufgereinigt. Eine solche Konzentration, Entsalzung oder Aufreinigung der Zielstruktur sind Anwendungen der Erfindung.

Eine besondere Anwendung der Erfindung ist die vollständige Absorption des Lösungsmittel einer Probe mit dem Zweck die Zielstrukturen in der Probe trockenzulegen. Durch die Trockenlegung werden die Zielstrukturen stabilisiert und insbesondere vor enzymatischem Abbau geschützt. Die Stabilisierung von Zielstrukturen durch Trockenlegung ist andere Anwendung der Erfindung.

Zielstrukturen im Sinne der Erfindung sind alle Moleküle oder supramolekularen Strukturen die konzentriert, entsalzt, stabilisiert oder aufgereinigt werden sollen. Zielstrukturen von besonderem Interesse sind natürliche, semisynthetische oder synthetische Makromoleküle, insbesondere biologische Polymere oder Oligomere, insbesondere polymere oder oligomere Verbindungen von Sacchariden, Aminosäuren oder Nukleinsäuren. Von besonderem Interesse sind oligomere oder polymere Nukleinsäuren, insbesondere DNS oder RNS Moleküle wie beispielsweise genomische, virale oder Plasmid-DNS oder cDNAs oder PCR Produkte oder Oligonukleotide oder virale RNS. Weitere Zielstrukturen von besonderem Interesse sind alle supramolekularen Strukturen, insbesondere biologische supramolekulare Strukturen wie beispielsweise virale Partikel.

Von besonderem Interesse im Sinne der Erfindung sind die Konzentration, Entsalzung, Stabilisierung oder Aufreinigung originaler oder verarbeiteter Proben folgenden Ursprungs: Menschliche oder tierische Fäkalien, menschliche, tierische oder pflanzliche Gewebe, Gewebe- oder Zellkulturen, Knochenmark, menschliche oder tierische Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Urin, Sperma, Gehirn-Rückenmarkflüssigkeit, Sputum, Abstriche, Pflanzen, Pflanzenteile und Extrakte, prokaryotische oder eukaryotische Mikroorganismen wie Bakterien und Hefen, Bodenproben, Schlamm, Abwasser, Trinkwasser oder Lebensmittel.

Um die Zielstrukturen in einer Probe im Sinne der Erfindung zu konzentrieren, zu entsalzen oder aufzureinigen muss die Probe mit dem Superabsorbenten oder dem superabsorptiven Kompositmaterial in Kontakt gebracht werden. Weiter müssen die nicht absorbierten Komponenten der Probe, insbesondere die Zielstrukturen, nach dem Kontakt von dem Superabsorbenten oder superabsorptiven Kompositmaterial

getrennt werden. Um den Kontakt und die Trennung im Sinne der Erfindung durchzuführen ist im allgemeinen die Verwendung eines Werkstücks notwendig. Im einfachsten Fall besteht das Werkstück aus einem Gefäss, in welchem der Superabsorbent oder das superabsorptive Kompositmaterial eingefüllt oder eingeklebt wird oder auf welches der Superabsorbent aufpolymerisiert wird. Der Kontakt wird durch Einbringen der Probe in das Gefäss hergestellt und die Trennung erfolgt durch Entfernen der nicht absorbierten Komponenten aus dem Gefäss beispielsweise durch Dekantieren, Sieben, Pipetieren, Absaugen, Zentrifugieren, Auswaschen oder Kombination dieser Schritte. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit den Kontakt und die Trennung mit anderen, routinemässig in der praktischen chemischen, biologischen und medizinischen Arbeit zur Verarbeitung von flüssigen Proben verwendeter Werkstücke, durchzuführen. Nicht restriktive Beispiele für Werkstücke, die im Sinne der Erfindung besonders geeignet sind, schliessen Probenröhrchen Zentrifugenröhrchen, Pipettenspitzen und Mikrotiterplatten ein.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen im Zusammenhang mit den Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1: Evaluierung der DNA-Konzentrationskapazität kugelförmiger Superabsorbenten bei Anwendung eines Ein-Schritt-Protokolls im 1ml-Massstab und Bestimmung des optimalen Verhältnisses von Kügelchen pro Volumen. 20µg/ml Plasmid-DNA (4.5kb) wurden mit 0, 3, 4 oder 5 kugelförmigen Molekularschwämmen inkubiert. Der DNA-Gehalt in Lösung wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260nm bestimmt. Im Zuge der Schwellung konzentrieren Molekularschwämme DNA in der flüssigen Umgebung. Bei bis zu 4 Kügelchen/ml ist das Ausmass der DNA-Konzentrierung direkt proportional zur beobachteten Volumenreduktion.

Fig. 2: Evaluierung der Kapazität kugelförmiger Molekularschwämme DNA verschiedener Formen im 1ml-Massstab in einem Schritt zu konzentrieren. Circa 20µg genomische DNA, Plasmid DNA und PCR-Produkt, und ca. 14µg Oligonukleotid DNA, wurden mit 0 oder 4 kugelförmigen Molekularschwämmen

inkubiert. DNA-Gehalt wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260nm bestimmt. Gleiche Volumeneinheiten jeder Probe wurden mittels 1% Agarose-Gelelektrophorese (2% für Oligonukleotide) getrennt, und DNA-Konzentrierung wurde nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert. Die Ergebnisse sind rechts gezeigt (Bahn 1: λ Hind III Grössenstandard, Bahn 2: ohne Kügelchen; Bahn 3: 4 Kügelchen). DNA verschiedener Typen und Grössen, inklusive grosser genomische DNA, „supercoiled“ Plasmid-DNA, PCR-Produkte als auch kurze Oligonukleotide werden durch Molekularschwämme quantitativ konzentriert.

10

Wege zur Ausführung der Erfindung

Bsp. 1: Prozedur zur Synthese von Polyacrylamid Kügelchen

Wässriges Natrium Alginat (12 ml; 4 % w/v, low viscosity, Sigma), Wasser (5 ml), wässriges Acrylamid (8 ml, 40 % w/v, purum, Fluka), wässriges N,N'-methylenebisacrylamid (4 ml, 2 % w/v, purum, Fluka), und N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (0.1 ml in 1 ml Wasser, puriss., absolut, Fluka) werden gemischt, in eine Spritze gefüllt, durch eine 1.2 mm Spritzennadel vertropft (mittels einer Spritzenpumpe; Vertropfungsrate 10 ml pro Minute) und in ein Becherglas, gefüllt mit einer gerührten Lösung Ammoniumperoxodisulfat (60 °C, 80 ml, 1 % w/v, MicroSelect, Fluka, enthält 0.1 M Calcium Chlorid) fallen gelassen. Nach dem Eintauchen in die Härtungslösung bilden sich Kügelchen. Diese werden nach 30 Minuten mittels Sieben isoliert und mit Wasser (5 mal je 100 ml) gewaschen. Die Calcium-Alginat-Polyacrylamid Kügelchen werden dann in eine wässrige Lösung von tri-Natrium-Citrat-5,5-Hydrat (100 ml, 0.1 M, extra pure, Merck) gegeben und equilibriert (6 h, RT). Danach werden die Kügelchen mittels Sieben isoliert und gewaschen (5 x 100 ml Wasser). Die Citrat Behandlung und die Waschschrte werden zweimal wiederholt um das Alginat vollständig zu entfernen. Die fertigen Kügelchen werden in Wasser gelagert.

30

Bsp. 2: Prozedur zur Synthese von superabsorptiven Kügelchen bestehend aus Poly(acrylamid-co-acrylsäure) durch basische Hydrolyse von Polyacrylamid Kügelchen

Polyacrylamid Kügelchen (100 g) hergestellt wie in Bsp. 1 beschrieben werden mit einer wässrigen Lösung von Kaliumhydroxid (500 ml, Siedetemperatur, 5 % w/v, Merck puriss.) versetzt. Nach fünfstündigem Rühren werden die Poly(acrylamid-co-acrylsäure) Kügelchen mittels Sieben isoliert und in demineralisiertes Wasser gegeben (5 L, 2 h). Die Wasch- und Siebschritte werden 2 mal wiederholt. Anschliessend werden die Poly(acrylamid-co-acrylsäure) Kügelchen bei Raumtemperatur oder bei erhöhter Temperatur (beispielsweise im Ofen bei 80 °C) getrocknet.

10 **Bsp. 3: Prozedur zur Synthese von Kügelchen aus supersorptiven Kompositmaterialien aus Poly(acrylamid-co-acrylsäure) und Polystyrolnanopartikeln**

Wässriges Natrium Alginat (12 ml; 4 % w/v, low viscosity, Sigma), eine Suspension von Polystyrolnanopartikeln (7 ml, Anteil Polystyrolnanopartikeln 15 % m/v),
 15 wässriges Acrylamid (8 ml, 40 % w/v, purum, Fluka), wässriges N,N'-methylenbisacrylamid (2 ml, 2 % w/v, purum, Fluka), und N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (0.1 ml in 1 ml Wasser, puriss., absolut, Fluka) werden gemischt, in eine Spritze gefüllt, durch eine 1.2 mm Spritzennadel vertropft (mittels einer Spritzenpumpe; Vertropfungsrate 10 ml pro Minute) und in ein Becherglas,
 20 gefüllt mit einer gerührten Lösung Ammoniumperoxodisulfat (60 °C, 80 ml, 1 % w/v, MicroSelect, Fluka, enthält 0.1 M Calcium Chlorid) fallen gelassen. Danach wird wie in Bsp. 1 und Bsp. 2 beschrieben verfahren.

Bsp. 4: Prozedur zur Synthese von Kügelchen aus von superabsorptiven

25 **Kügelchen bestehend aus Poly(acrylamid-co-[3-(Methacryloylamino)propyl]trimethylammonium chlorid)**

Wässriges Natrium Alginat (12 ml; 4 % w/v, low viscosity, Sigma), Wasser (5 ml),
 wässriges Acrylamid (4 ml, 40 % w/v, purum, Fluka), wässriges [3-(Methacryloylamino)propyl] trimethylammonium chlorid (4 ml, 50%, Aldrich)
 30 wässriges N,N'-methylenbisacrylamid (2 ml, 2 % w/v, purum, Fluka), und N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (0.1 ml in 1 ml Wasser, puriss., absolut, Fluka) werden gemischt, in eine Spritze gefüllt, durch eine 1.2 mm Spritzennadel vertropft (mittels einer Spritzenpumpe; Vertropfungsrate 10 ml pro Minute) und in ein Becherglas, gefüllt mit einer gerührten Lösung Ammoniumperoxodisulfat (60 °C, 80

ml, 1 % w/v, MicroSelect, Fluka, enthält 0.1 M Calcium Chlorid) fallen gelassen.
Danach wird wie in Bsp. 1 und Bsp. 2 beschrieben verfahren.

Bsp. 5: Prozedur zur Synthese von pulverförmigen Poly(acrylamid-co-[3-

5 **(Methacryloylamino)propyl]dimethyl(3-sulfopropyl)ammonium hydroxid)**

Wässriges Acrylamid (10 ml, 40 % w/v, purum, Fluka), wässriges [3-(Methacryloylamino)propyl]dimethyl(3-sulfopropyl)ammonium hydroxide (10 ml, 30%, Aldrich) wässriges N,N'-methylenebisacrylamid (5 ml, 2 % w/v, purum, Fluka) werden gemischt. Die Polymerisation wird mittels Ammoniumperoxodisulfat /
10 Natrium Pyrosulfit (je 50 mg in 1 ml Wasser) initiiert. Nach einer Stunde wird das blockförmige Polymer im Mixer zerkleinert, mit destiliertem Wasser (5 mal 1 L, je 0.5 h) gewaschen und im Ofen (80 °C) getrocknet.

Bsp. 6: Trockenlegung und Stabilisierung von Humanurin mittels

15 **pulverförmigen Poly(acrylamid-co-[3-(Methacryloylamino)propyl]dimethyl(3-sulfopropyl)ammonium hydroxid)**

Poly(acrylamid-co-[3-(Methacryloylamino)propyl]dimethyl(3-sulfopropyl)ammonium hydroxid) (1.0 g, hergestellt gemäss Bsp. 5) werden in 50 ml Humanurin gegeben. Nach wenigen Minuten ist die Flüssigkeit vollständig absorbiert.

20

Bsp. 7: Konzentration von DNA mittels superabsorptiven Kügelchen bestehend aus Poly(acrylamid-co-acrylsäure)

Superabsorptiven Kügelchen hergestellt nach Bsp. 2, weisen im trockenen Zustand einen Durchmesser von 2mm auf. Das Schwellverhalten von Superabsorbenten wird
25 durch Ionenkonzentration und pH beeinflusst. In den folgenden Experimenten wurde eine geeignete aber nicht restriktive Modellbedingung ausgewählt (40mM NaCl wässrige Lösung). Unter dieser Bedingung schwellen die Kügelchen zu einem Durchmesser von 6.5 - 7mm, was einer Sorption von 140 - 175µl Flüssigkeit pro Kügelchen entspricht. Bei Erreichen vollständiger Schwellung wurde die
30 verbleibende Flüssigkeit von den geschwollenen Kügelchen durch Pipettieren abgetrennt, quantifiziert und spektrophotometrisch analysiert. Absorptionswerte von Kontrollexperimenten (40mM NaCl; 0, 3, 4, oder 5 Kügelchen/ml) wurden von den experimentellen Werten (DNA, 40mM NaCl; 0, 3, 4, oder 5 Kügelchen/ml) abgezogen. Die Resultate sind in Fig. 1 und 2 dargestellt.

Patentansprüche

- 1) Verfahren zur Konzentration und Aufreinigung von biologischen Substanzen gekennzeichnet durch Kontaktierung einer flüssigen Probe, welche eine oder mehrere Zielstrukturen enthält, mit Superabsorbenten oder superabsorptiven Kompositmaterialien.
- 2) Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass die Zielstrukturen in der flüssigen Probe suspendiert oder gelöst sind.
- 3) Verfahren nach Anspruch 2 dadurch gekennzeichnet, dass die Probe neben den Zielstrukturen weitere gelöste Verbindungen enthält.
- 4) Verfahren nach Anspruch 2 oder 3 dadurch gekennzeichnet, dass durch den Kontakt der Probe mit dem Superabsorbenten oder superabsorptiven Kompositmaterialien das Lösungsmittel teilweise oder vollständig absorbiert wird.
- 5) Verfahren nach Anspruch 3 dadurch gekennzeichnet, dass durch den Kontakt eine, mehrere, oder alle anderen gelösten Verbindungen teilweise oder vollständig absorbiert werden.
- 6) Verfahren nach Anspruch 2 oder 3 dadurch gekennzeichnet, dass das Lösungsmittel ein hydrophiles Lösungsmittel, bevorzugterweise Wasser und / oder ein Gemisch von Wasser mit in Wasser mischbaren Lösungsmitteln ist.
- 7) Verfahren nach Anspruch 2 oder 3 dadurch gekennzeichnet, dass die Zielstrukturen durch den Kontakt der Probe mit dem Superabsorbenten oder superabsorptiven Kompositmaterialien nicht absorbiert werden.
- 8) Verfahren nach Anspruch 2 oder 3 dadurch gekennzeichnet, dass die Zielstrukturen Moleküle oder supramolekulare Strukturen sind.
- 9) Verfahren nach Anspruch 8 dadurch gekennzeichnet, dass die Zielstrukturen natürliche, semisynthetische oder synthetische biologische Makromoleküle, insbesondere biologische Polymere oder Oligomere, insbesondere polymere oder oligomere Verbindungen von Sacchariden oder Aminosäuren oder Nukleinsäuren sind.
- 10) Verfahren nach Anspruch 9 dadurch gekennzeichnet dass die polymeren oder oligomeren Nukleinsäuren DNS oder RNS sind.

- 11) Verfahren nach Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet dass die DNS genomische, virale oder Plasmid DNS Moleküle oder PCR Produkte oder Oligonukleotide sind.
- 12) Verfahren nach Anspruch 8 dadurch gekennzeichnet dass die
5 supramolekularen Strukturen virale Partikel sind.
- 13) Verfahren nach Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, dass die Zielstrukturen virale RNS Moleküle sind.
- 14) Superabsorbenten oder superabsorptive Komponenten zur Konzentration oder
10 Aufreinigung von biologischen Substanzen dadurch gekennzeichnet, dass diese entweder aus hydrophilen Polymeren und/oder aus natürlichen und/oder aus semisynthetischen und/oder synthetischen Polymeren bestehen.
- 15) Superabsorbenten oder superabsorptive Komponenten nach Anspruch 14 dadurch gekennzeichnet, dass der Vernetzungsgrad 0.0001 – 10 %, bevorzugterweise 0.01 % - 1 % beträgt.
- 15 16) Superabsorbenten oder superabsorptive Komponenten nach Anspruch 14 dadurch gekennzeichnet, dass diese aus Derivaten der Acrylsäure, bevorzugterweise aus deren Amiden oder Estern bestehen.
- 17) Superabsorbenten oder superabsorptive Komponenten nach Anspruch 14
20 dadurch gekennzeichnet, dass diese aus Derivaten der Methacrylsäure, bevorzugterweise aus deren Amiden oder Estern bestehen.
- 18) Superabsorbenten oder superabsorptive Komponenten nach Anspruch 16
25 dadurch gekennzeichnet, dass diese aus ionisierten oder ionisierbaren Derivaten der Acrylsäure bestehen, wobei die ionisierten oder ionisierbaren Derivate bevorzugterweise Monomere sind und in einer Konzentration von 0.1 – 100 % der totalen Monomerkonzentration vorliegen.
- 25 19) Superabsorbenten oder superabsorptive Komponenten nach Anspruch 18 dadurch gekennzeichnet, dass diese in Pulverform, globulären Partikeln oder als Beschichtungen einer Oberfläche vorliegen. Bevorzugterweise liegen sie in Form kugelförmiger Partikel vor, weiter bevorzugt als Kugeln mit einem
30 Durchmesser von 0.001 bis 10 mm, insbesondere als Kugeln mit einem Durchmesser von 0.01 – 0.5 mm.
- 20) Superabsorbenten oder superabsorptive Komponenten nach einem der Ansprüche 14 bis 19 dadurch gekennzeichnet, dass sie grosse Mengen hydrophiler Lösungsmittel, insbesondere Wasser aufnehmen können.

- 21) Superabsorbenten oder superabsorptive Komponenten nach einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass diese in einem Werkstück vorliegen und bevorzugterweise die kontaktierten Probe von den Superabsorbenten oder superabsorptiven Kompositmaterialien trennt.
- 5 22) Superabsorbenten oder superabsorptive Komponenten nach einem der Ansprüche 14 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass diese in das Werkstück eingefüllt oder eingeklebt oder auf das Werkstück aufpolymerisiert sind.
- 10 23) Superabsorbenten oder superabsorptive Komponenten nach einem der Ansprüche 14 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass das Werkstück ein Probenröhrchen oder ein Zentrifugenröhrchen oder eine Pipettenspitze oder eine Mikrotiterplate ist.
- 15 24) Verwendung der Superabsorbenten oder superabsorptive Komponenten nach einem der Ansprüche 14 bis 23 zur Konzentration oder Aufreinigung von natürlichen, semisynthetischen oder synthetischen biologischen Makromolekülen, insbesondere polymeren oder oligomeren Verbindungen von Sacchariden oder Aminosäuren oder Nukleinsäuren.
- 20 25) Verwendung der Superabsorbenten oder superabsorptive Komponenten nach einem der Ansprüche 14 bis 24 zur Konzentration oder Aufreinigung von polymeren oder oligomeren Nukleinsäuren wie DNS oder RNS.
- 26) Verwendung der Superabsorbenten oder superabsorptive Komponenten nach einem der Ansprüche 14 bis 25 zur Konzentration oder Aufreinigung von RNS oder genomischer DNS oder viraler DNS oder Plasmid DNS oder von PCR Produkten oder von Oligonukleotiden.

Referenzen

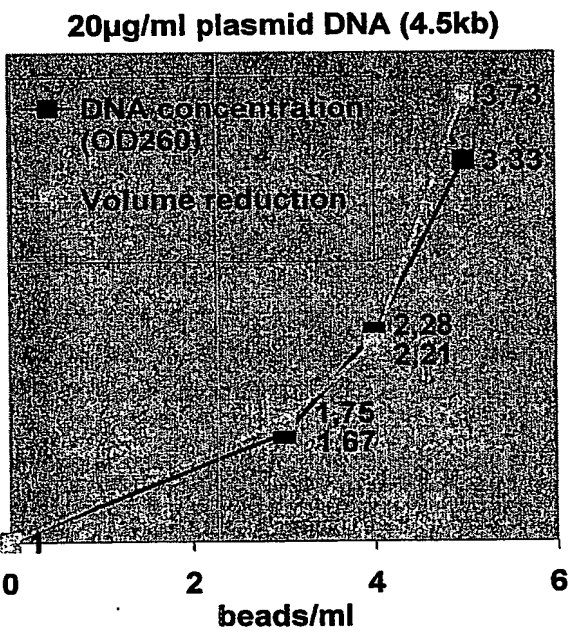
- Bucholz 1998: Bucholz F. L.; Graham A. T.; Eds., Modern superabsorbent polymer technology", Wiley-VCH, New York 1998.
- 5 Chacon 2000: Chacon D.; Hsieh, Y.-L.; Kurth M.J.; Krochta J.M.; Swelling and protein absorption/desorption of thermo-sensitive lactitol-based polyether polyol hydrogels; Polymer 2000, 41(23), 8257-8262.
- Iritani 1993: Iritani, E.; Iwata M.; Murase T.; Concentration of proteinaceous solutions with superabsorbent hydrogels; Separation Science and
10 Technology 1993, 28(10), 1819-36.
- Iritani 2001: Iritani E.; Mukai Y.; Ueki, C.; Concentration and desalination of protein solutions with superabsorbent hydrogels; Funtai Kogaku Kaishi 2001, 38(8), 555-561.
- Iritani 2003: Iritani, E.; Mukai, Y.; Ueki, C.; Katagiri, N.; Simultaneous operation
15 of fractionation and concentration of binary protein mixture with particles of superabsorbent hydrogel; Funtai Kagaku Kaishi 2003, 40(1), 4-10.
- Prazeres 1995: Prazeres, D.M.; Concentration of BSA using a superabsorbent polymer: process evaluation; Journal of Biotechnology 1995, 39(2),
20 157-64.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Materialien und Verfahren zur Konzentration, Entsalzung, Aufreinigung oder Stabilisierung von biologischen Substanzen, insbesondere biologischen Makromolekülen, mittels Superabsorbenten oder superabsorptiven Kompositmaterialien.

5

Figur 1



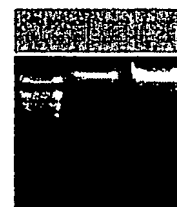
Figur 2

genomische DNA aus Blut (approx. 30kb)				Rückgewinnung
	ohne beads	4 beads	Faktor	
OD260	0,38	0,74	1,95	88%
Volumen (ml)	1	0,45	2,22	

Plasmid (7,2 kb)				Rückgewinnung
	ohne beads	4 beads	Faktor	
OD260	0,39	0,81	2,08	91%
Volumen (ml)	1	0,44	2,27	

PCR-Produkt (500bp)				Rückgewinnung
	ohne beads	4 beads	Faktor	
OD260	0,43	0,93	2,16	93%
Volumen (ml)	1	0,43	2,33	

Oligo (21 Nukleotide)				Rückgewinnung
	ohne beads	4 beads	Faktor	
OD260	0,39	0,87	2,23	94%
Volumen (ml)	1	0,42	2,38	



PCT/IB2004/004125



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.